

COMPORTAMIENTO DE OXITETRACICLINA EN CAMARÓN DE CULTIVO *Litopenaeus vannamei* Y LA SENSIBILIDAD A TRES ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS DE *Vibrio* AISLADAS DE LOS ORGANISMOS

BEHAVIOR OF OXYTETRACYCLINE IN SHRIMP CULTURED *Litopenaeus vannamei* AND SENSITIVITY TO THREE ANTIBIOTICS OF BACTERIA OF *Vibrio* ISOLATED FROM THE ORGANISMS

María del Carmen Bermúdez-Almada*, Angelica Espinosa-Plascencia, María Luisa Santiago-Hernández, Carlos Joel Barajas-Borgo y Evelia Acedo-Félix

Laboratorio de Análisis Biológicos, Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD, AC). Hermosillo, Sonora, México. Carretera La Victoria Km. 0.6. Apdo. Postal 1735, C.P. 83000, Tel. (662) 289-2400; Fax (662) 280-00-57.

RESUMEN

La vibriosis es una infección importante que afecta los cultivos de camarón. Oxitetraciclina (OTC) es uno de los antibióticos empleados para su control. Se determinó la acumulación máxima (C_{max}) y tiempo de retiro de OTC en hepatopáncreas y músculo de camarón. Se identificó la especie de *Vibrio* más abundante en camarón y la sensibilidad a OTC, enrofloxacin y florfenicol. Se emplearon cuatro estanques de una granja comercial, tres recibieron alimento con OTC (5233 ± 421 mgKg⁻¹) por 14 días y alimento sin antibiótico durante 16 días. El estanque control recibió alimento sin OTC. Los muestreos fueron al día 0, 7 y 14 del tratamiento y 0, 7, 14 y 16 del retiro. Se aislaron bacterias de *Vibrio* de músculo y hepatopáncreas, se identificaron molecularmente y se probó su sensibilidad a OTC, enrofloxacin y florfenicol. La C_{max} promedio de OTC fue $33,45 \pm 4,11$ μgg^{-1} en músculo y $223,11 \pm 89,03$ μgg^{-1} en hepatopáncreas, alcanzándose a los 2 y 12 días de la terapia, respectivamente. La eliminación de OTC del organismo ocurrió entre los diez y dieciséis días. Se identificó *V. parahaemolyticus* en 51% de las cepas aisladas. No se encontró *V. cholerae* O1 toxigénica. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias establecidas fueron 0,75-100; 0,25-10 y 0,5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para OTC, enrofloxacin y florfenicol, respectivamente.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, acumulación, oxitetraciclina, tiempo de retiro.

ABSTRACT

Vibriosis is an important infection which affects the shrimp farming. Oxytetracycline (OTC) is one of the antibiotics used for its control. The maximum accumulation (C_{max}) and withdrawal time of OTC in hepatopancreas and muscle of shrimp were determined. The most abundant *Vibrio* species in shrimp was identified, as well as its sensitivity to OTC, enrofloxacin and florfenicol. Four ponds of a commercial farm were used, three received feed with OTC (5233 ± 421 mg Kg⁻¹) for 14 days, and afterward without antibiotic for 16 days. The control pond received a diet without OTC. Shrimp were

sampled at days 0, 7 and 14 of the treatment, and 0, 7, 14 and 16 after withdrawal of OTC. *Vibrio* bacteria were isolated from muscle and hepatopancreas, molecularly identified and tested their sensitivity to OTC, enrofloxacin and florfenicol. The mean C_{max} of OTC was $33,45 \pm 4,11$ $\mu\text{g g}^{-1}$ in muscle and $223,11 \pm 89,03$ $\mu\text{g g}^{-1}$ in hepatopancreas, between days 2 and 12 of the therapy, respectively. The withdrawal time of OTC in hepatopancreas and muscle were at days 10 and 16, respectively. *Vibrio parahaemolyticus* was identified in 51% of the isolates, while *V. cholerae* O1 toxigenic was not found. Minimum Inhibitory Concentration for OTC, enrofloxacin and florfenicol, were 0, 75-100; 0, 25-10 and 0, 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, accumulation, oxytetracycline, withdrawal time.

INTRODUCCIÓN

En el año 2010 la producción acuícola mundial de crustáceos se conformaba de especies de agua dulce (29,4%) y especies marinas (70,6 %), siendo el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) el predominante de las especies marinas, representando el 15 % del valor total de los productos pesqueros comercializados a nivel internacional. Esta especie se ha introducido con mayor éxito a nivel internacional en la acuicultura, representando en el año 2010 el 71,8 % de la producción mundial de todas las especies de camarones marinos cultivados, siendo los principales productores Asia y América Latina con un 77,9 % (FAO, 2012).

Entre los principales países exportadores de este crustáceo se encuentra Tailandia, China y Vietnam. Estados Unidos de América sigue siendo el principal importador de camarón seguido de Japón (FAO, 2012). Sin embargo, esta industria ha enfrentado serios problemas debido a enfermedades virales y bacterianas que han ocasionado pérdidas cuantiosas en este sector productivo. En el 2011, los brotes de enfermedades acabaron prácticamente con la producción de cría de camarón marino en Mozambique (FAO, 2012), y en México el impacto de las enfermedades en la producción acuícola ha generado grandes pérdidas económicas (Montserrat y

*Autor para correspondencia: María del Carmen Bermúdez-Almada
Correo electrónico: cbermudez@ciad.mx

Recibido: 21 de febrero de 2014

Aceptado: 26 de agosto de 2014

Herrera, 2000; Burge *et al.*, 2007; Decamp *et al.*, 2008), siendo las infecciones bacterianas unas de las más importantes (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Ganesh *et al.*, 2010). Las enfermedades ocasionadas por bacterias del género *Vibrio* han afectado seriamente la industria camarónica. Específicamente en el Noroeste del país, las infecciones en los cultivos de camarón por este género bacteriano han provocado una disminución considerable en la producción y el cierre de un gran número de granjas camarónicas.

Las enfermedades más frecuentes que afectan al camarón son la vibriosis sistémica, la erosión bacteriana del caparazón, el Síndrome de Zoea II, la hepatopancreatitis necrotizante (NHP) y las infecciones por bacterias filamentosas (*Leucothrix mucor*), que causan la muerte de los organismos (Leyton y Riquelme, 2008).

Entre las especies de *Vibrio* más frecuentes que afectan a humanos y al camarón se encuentran *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* y *V. damsela* (Thompson *et al.*, 2010; Leyton y Riquelme, 2008).

Para contrarrestar las infecciones bacterianas en las granjas camarónicas, se emplean antibióticos como, enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFC) y oxitetraciclina (OTC), siendo este último el más utilizado. Sin embargo, su uso frecuente y prolongado ha inducido el desarrollo de bacterias resistentes que representan un riesgo de salud pública (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006; Tendencia y De la Peña, 2001). Aun cuando la OTC ha sido aprobada para uso terapéutico en el cultivo de peces, no se ha establecido claramente su comportamiento cinético en cultivos de camarón *L. vannamei*. En un estudio realizado por Gómez-Jiménez *et al.*, (2008) bajo condiciones controladas de laboratorio donde se administró a camarón *L. vannamei* una dieta conteniendo 5000 mgKg⁻¹ de OTC durante 14 días, se observó que los niveles de acumulación (C_{max}) de OTC fueron de 33,54±11,19 µgg⁻¹ en músculo, 194,37±16,11 µgg⁻¹ en hepatopáncreas y 18,79±5,87 µg mL⁻¹ en hemolinfa y el tiempo requerido para la eliminación de OTC de los distintos tejidos fue de 10 días.

Sin embargo, el comportamiento cinético de OTC en granjas de cultivo puede variar ya que existen diversos factores ambientales que influyen en la acumulación del antibiótico en el organismo. Es de vital importancia conocer la acumulación de un fármaco en los tejidos y su tiempo de eliminación, para establecer terapias adecuadas y con mayor eficacia en el control de las infecciones bacterianas, sin dejar de lado aspectos tan importantes como el evitar la residualidad del antibiótico en los tejidos que son destinados al consumo humano, y la permanencia de estos residuos en los sistemas de cultivo para disminuir la generación de resistencia bacteriana.

El objetivo de esta investigación fue establecer la acumulación máxima (C_{max}) y el tiempo de eliminación de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* e identificar la especie de *Vibrio* más abundante aislada de los tejidos de camarón y determinar su sensibilidad a los antibióticos Oxitetraciclina, Enrofloxacin y Florfenicol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El estudio se realizó en una granja de cultivo intensivo de camarón *L. vannamei*, ubicada a 28°41'41,43''N; 111°51'01,06''W del Pacífico Mexicano, en Bahía de Kino Sonora, México. Se emplearon organismos en etapa juvenil con un peso promedio de 6,44±0,02 g y una talla de 79,82±0,66 mm, cultivados en estanques con dimensiones promedio de 7,2±0,75 ha y una profundidad de 1,7±0,1 m, sembrados a una densidad de 32 organismos por m². La aireación de los estanques fue provista mecánicamente con aireadores de paleta. El experimento se realizó con tres repeticiones y se usó un grupo control.

Parámetros fisicoquímicos del agua

La medición de los parámetros fisicoquímicos incluyó temperatura y oxígeno disuelto (OD), medidos 2 veces al día (06:00 y 17:00 h) en los 4 estanques con un oxímetro YSI 55 (TSY Incorporated-Yellow Springs, OH, USA); salinidad y pH que se determinaron semanalmente usando un refractómetro Vitalsine SR 6 y un potenciómetro pH Ecosense® (YSI pH10) y nitrógeno y amonio total (TAN), los cuales fueron medidos semanalmente empleando un fotómetro (Ecosense® Mod. 9500). Esta técnica se basa en la reacción colorida producida entre el reactivo de NESSLER (yodomercuriato potásico) y el amonio en un medio alcalino, generando un compuesto colorido susceptible de ser medido fotométricamente a una longitud de onda de 425 nm.

Régimen de alimentación de los camarones

Se utilizó un alimento comercial libre de antibióticos y otro adicionado con OTC a una concentración teórica de 5000 mgKg⁻¹ por ser ésta la dosis que se utiliza en las granjas camarónicas de la zona de estudio. Ambos alimentos se analizaron antes de su administración mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para confirmar la concentración de OTC en el alimento, siguiendo la metodología propuesta por Houglum *et al.* (1997) que se basa en una extracción sólido-líquido. Los organismos se alimentaron 3 veces al día a un 3% de la biomasa, administrando el 40% del alimento en la mañana, 20% por la tarde y 40% en la noche. La composición del alimento se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la dieta para camarón.
Table 1. Composition of shrimp diet.

Ingredientes	%
Harina de pescado	26,2
Harina de soya	25
Gluten de maíz	6
Aceite de pescado	2,03
Lecitina de soya	2
Mezcla vitamínica	0,5
Vitamina C	0,05
Aglutinante	0,8
Fosfato monobásico	4,36
Metionina	0,02
Harina de camarón	0,8

Tres de los estanques de cultivo recibieron la dieta adicionada con OTC durante catorce días (etapa de tratamiento). Posteriormente, se inició la etapa de retiro, en la que se suministró alimento sin antibiótico por dieciséis días, similar al régimen de alimentación reportado por Gómez-Jiménez *et al.*, (2008). Se empleó un estanque como control, el cual se mantuvo con alimento sin OTC durante ambas etapas experimentales.

Muestreo de organismos

Se colectaron 180 organismos en cada muestreo, en los días 0 (antes de iniciar el tratamiento con OTC), 1, 7 y 14 de la etapa de tratamiento y 1, 7, 14 y 16 de la etapa de retiro. Los organismos muestreados se colocaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y se transportaron en hielo al Laboratorio de Análisis Biológicos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. para el análisis microbiológico. El resto de los organismos se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Aseguramiento de la calidad de los datos

Para asegurar la calidad de los datos analíticos generados se determinaron tres parámetros de validación de la metodología empleada para el análisis de OTC en los tejidos. Éstos fueron, linealidad, sensibilidad y exactitud, siguiendo los procedimientos establecidos por Garfield (1993). Para la determinación de linealidad se preparó una curva de calibración de OTC en concentraciones de 0,01, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 y 5,0. Cada solución estándar se inyectó seis veces en el HPLC, se elaboró la curva de calibración y se obtuvo el valor del coeficiente de correlación (r^2) mediante un análisis de regresión.

La sensibilidad del método se estableció mediante la determinación del Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) de OTC. La exactitud se evaluó a través del porcentaje de recuperación del análisis de 10 muestras de músculo de camarón *L. vannamei* libres de antibiótico, las cuales fueron adicionadas con 5 µL de una solución estándar de OTC a una concentración 320 µg mL⁻¹, obteniendo una concentración final de 3,2 µg g⁻¹. Se consideró como valor aceptable los porcentajes de recuperación en el intervalo de 70-110%, de acuerdo a las normas de validación para los métodos cromatográficos (USDA, 1987).

Acumulación de OTC en los tejidos de camarón

Para determinar los niveles de OTC en los tejidos, se tomaron aproximadamente 500 g de camarón colectado en los distintos muestreos. Se extrajeron los hepatopáncreas y se colocaron en un tubo de plástico de 50 mL, éstos se homogeneizaron empleando una espátula de acero inoxidable. Se tuvo cuidado de no tomar parte del intestino del camarón para evitar la contaminación de la muestra. El músculo se homogeneizó empleando un procesador de alimentos Philips HR (Philips Mexicana, S.A de C.V. México, DF.). Ambas muestras se mantuvieron en congelación a -20°C hasta el análisis de OTC, el cual se realizó por triplicado siguiendo

la metodología reportada por Gómez-Jiménez *et al.* (2008), utilizando la técnica de extracción de dispersión de matriz en fase sólida.

La concentración de OTC se determinó utilizando HPLC en fase inversa y una columna Supelco Nucleosil C₁₈ de 150 x 4,6 mm de diámetro interno (Supelco Co., St. Louis MO. USA). Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 9010 (Palo Alto, CA. USA) equipado con un detector ultravioleta-visible Varian 9050 (Palo Alto, CA. USA), a una longitud de onda de 365 nm. La fase móvil consistió en ácido oxálico 0,2M:acetonitrilo:metanol en proporciones 70:27:3 (v/v/v), con un flujo isocrático de 1 mL min⁻¹ y un tiempo de corrida de 8 min. Se empleó un estándar de OTC de alta pureza (Sigma, Aldrich St. Louis MO. USA) a una concentración de 3,2 µg mL⁻¹ como referencia para calcular la concentración del antibiótico en las muestras. Los datos obtenidos se analizaron empleando estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión, en el programa computacional NCSS (2007).

Aislamiento e identificación de cepas de *Vibrio*

El recuento de bacterias de *Vibrio* en músculo y hepatopáncreas de los organismos se realizó empleando placas de Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (Difco, Diagnostic Systems, USA) adicionadas con 2,5 % de NaCl, realizando diluciones en agua peptonada alcalina (APW). Las placas se incubaron a 37° C por 24 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el recuento bacteriano y el aislamiento de colonias. Éstas se preservaron en Agar Base Sangre (ABS) (Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) con 3,5 % de NaCl para su identificación por técnicas moleculares. Posteriormente se sembraron en caldo soya tripticasa (CST) (Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) con 3,5 % de NaCl, para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Identificación molecular de cepas de *Vibrio*

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se realizó por la técnica de lisis rápida propuesta por Veyrat *et al.* (1999). La concentración de ADN de las cepas se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Tech. Wilmington, DE. USA), a una absorbancia de 260 nm. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores se presenta en la Tabla 2. Su amplificación se efectuó en un termociclador Perkin Elmer (DNA Thermal Cycler 480). El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94° C por 6 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación de 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. La temperatura de alineación (T_m) varió con la especie a identificar (Tabla 2). Se utilizaron como cepas control: *V. parahaemolyticus* CAIM 320T, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. cholerae* O1. La amplificación del oligonucleótido en el producto obtenido por PCR se comprobó cargando 10 µL en geles de agarosa (Sigma, Aldrich St. Louis MO, USA) al 1,2 % y una fuente de poder FOTO/Force 250. La electroforesis se corrió a 85 Volts por 55 min con colorante de bromuro de etidio (24 µg mL⁻¹) y marcadores de peso molecu-

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para la identificación de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.**Table 2.** Sequence of oligonucleotides for identification of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*.

Especie	Iniciador	Tm* (°C)	Amplicon (pb)**
<i>Vibrio cholerae</i>	302 F	60	302
Ctx	5'-CTCAGACGGGATTGTTAGGCACG-3' 302 R 5' TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG 3'		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VPR72H-R 5'-CGAATCCTTGAACATACGCAG-3' VPR72H-F 5'-TGCGAATTCGATAGGGTGTTA-3'	58	372

*Tm: temperatura de alineación

**pb: pares de bases

lar para DNA de 100 pb (Ladder BIO-RAD, No 170-8200) y PCR Markers (Promega, Madison, WI. USA).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para esta determinación se siguió el protocolo propuesto por Alderman y Smith (2001), partiendo de los cultivos bacterianos aislados de músculo y hepatopáncreas de camarón. Se prepararon soluciones estándar de los tres antibióticos más utilizados en la camaronicultura como son OTC, ENRO y FFC (Sigma, Aldrich St Louis, MO. USA) con buffer de fosfato estéril a las siguientes concentraciones: 0,5; 0,75; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para OTC y 0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 5,0 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ENRO y FFC. Los tubos con caldo Mueller-Hinton (Difco, Diagnostic Systems, USA), adicionados con 3,5 % de NaCl se inocularon con 100 μL del cultivo bacteriano y se incubaron a 37°C por 24-48 h, determinando como valor de inhibición, la concentración del antibiótico en la que no se observó crecimiento bacteriano. Los controles positivos empleados fueron cepas tipificadas de *V. parahaemolyticus* y *V. splendidus*. Como control negativo se usó el medio de cultivo sin bacterias y sin antibióticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros fisicoquímicos en el sistema de cultivo de camarón

La temperatura en el sistema de cultivo evaluado se mantuvo en 29,17 \pm 0,48°C y 31,30 \pm 0,32°C (para mañana y tarde, respectivamente). Los niveles de OD en el agua de los estanques fueron altos con concentraciones de 3,45 \pm 0,53 mg L^{-1} por la mañana y 6,46 \pm 0,95 mg L^{-1} por la tarde; solamente uno de los estanques registró ocasionalmente valores de 1,5 a 3,0 mg L^{-1} . Cuando la fotosíntesis es más rápida que la respiración el oxígeno se acumula y el dióxido de carbono disminuye en el agua del estanque. Esta es la situación normal durante el día. Por la noche la fotosíntesis se detiene pero la respiración continua, por lo que el oxígeno disminuye y el dióxido de carbono se incrementa (Boyd, 2001).

La salinidad del agua de los estanques fue de 37,6 \pm 1,56 ‰. El valor promedio de pH fue de 8,19 \pm 0,082, sin

variaciones significativas y la concentración de amonio no ionizado fue de 0,2 \pm 0,03 mg L^{-1} .

Los cambios en los parámetros fisicoquímicos en los sistemas de cultivo pueden generar estrés en los organismos y afectar su respuesta inmune, favorecer el crecimiento de patógenos, la producción de toxinas y alterar los ciclos de muda (Cuzon *et al.*, 2004; Chang-Che y Jiann-Chu, 2008). Se consideran óptimos para el desarrollo de *L. vannamei* temperaturas de 27,9 a 31,2°C, valores de OD mayores a 4 mg L^{-1} y una salinidad <20 ‰ (Hernández *et al.*, 2006; Auro y Ocampo, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Por tanto, los parámetros mantenidos en el sistema de cultivo evaluado se encontraron dentro de estos valores excepto la salinidad. Sin embargo, Li *et al.* (2008), reportaron que *L. vannamei* es capaz de tolerar intervalos de salinidad que van de 1-50 ‰, sin que se vea limitado su desarrollo.

Aseguramiento de la Calidad de los Datos

Los parámetros de validación del método para el análisis de OTC dieron como resultado en la linealidad un Coeficiente de Correlación $r^2 = 0,9999$. Los Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC) para OTC fueron de 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Éstos fueron menores al Límite Máximo de Residuos (LMR) establecido para OTC en músculo de peces, que es de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la Unión Europea y 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ en Estados Unidos de Norteamérica (Nogueira-Lima, 2006; FDA, 2014). Para la exactitud, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio en las muestras adicionadas con OTC de 89,0 \pm 8,84 %, el cual está dentro del intervalo de 70-110% considerado como aceptable (USDA, 1987). Los parámetros de validación evaluados estuvieron dentro de las especificaciones del USDA (1987), y con ello se asegura la calidad de los datos generados en la investigación.

Nivel de OTC en el alimento

La concentración de OTC en el alimento fue de 5233 \pm 421 mg Kg^{-1} , comprobando que la adición del fármaco estuvo en un nivel cercano al teórico (5000 mg Kg^{-1}), y que la dieta fue preparada adecuadamente. Por otra parte, se confirmó que no existía contaminación con OTC u otro antibiótico en la dieta utilizada en la etapa de retiro y en el estanque empleado como control.

Acumulación de OTC en los tejidos de camarón

El promedio en la concentración máxima (C_{max}) de OTC en el hepatopáncreas de los organismos que recibieron el tratamiento fue de $223,11 \pm 89,03 \mu\text{g g}^{-1}$ y en músculo de $33,45 \pm 4,11 \mu\text{g g}^{-1}$. El tiempo en el cual se alcanzó la C_{max} en los organismos para cada uno de los estanques de cultivo fue variable ocurriendo desde los 2 hasta los 12 días. La Tabla 3 muestra los valores de acumulación máxima de OTC y el tiempo requerido por los organismos para alcanzar esos niveles en cada uno de los estanques. Estos resultados fueron similares a los reportados por Gómez-Jiménez *et al.* (2008) en un estudio realizado bajo condiciones controladas en laboratorio y por Santiago-Hernández (2009) en una investigación llevada a cabo en granja, quienes emplearon una dieta medicada a una concentración teórica de 5000 mg Kg^{-1} de OTC y obtuvieron la máxima acumulación del antibiótico en músculo entre los 8 y 12 días de terapia y a los 2 días en hepatopáncreas. Los niveles de acumulación de OTC fueron similares a los de nuestro estudio.

Tabla 3. Concentración máxima de OTC y tiempo requerido para su acumulación en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* cultivado.

Table 3. Maximum concentration of OTC and time required for accumulation in muscle and hepatopancreas of shrimp *L. vannamei* cultured.

	Músculo ($C_{max} \mu\text{g g}^{-1}$)	Tiempo (días)	Hepatopáncreas ($C_{max} \mu\text{g g}^{-1}$)	Tiempo (días)
Estanque 1	$34,76 \pm 0,95$	4	$337,17 \pm 0,85$	4
Estanque 2	$27,88 \pm 1,67$	2	$212,46 \pm 0,36$	12
Estanque 3	$37,70 \pm 4,00$	8	$111,90 \pm 5,80$	8
X \pm DE	$33,45 \pm 4,11$		$223,11 \pm 89,03$	

Son diversos los factores que intervienen en la acumulación de los antibióticos en los tejidos, resultando difícil determinar cuál de ellos influye más en la acumulación de OTC. Esto debido a que los sistemas de cultivo son dinámicos y existen interacciones entre los elementos que los conforman. La salinidad y la temperatura influyen en la acumulación y la eliminación de OTC, ya que cuando la temperatura se incrementa, la eliminación del antibiótico ocurre más rápidamente (Nogueira-Lima *et al.*, 2006), y la salinidad contribuye a la formación de complejos o quelación del antibiótico.

Las comunidades bióticas, la densidad del cultivo, el estado inmunológico, el desarrollo de los organismos y la intervención humana en el ciclo de producción influyen también en la farmacocinética. La asociación de OTC con los sedimentos y las partículas suspendidas orgánicas e inorgánicas afectan el transporte del antibiótico en el sistema acuático (Rose y Pedersen, 2005). Todos estos factores ocasionan variabilidad en la acumulación del fármaco en los organismos, modificando los tiempos y la concentración máxima que se puede alcanzar. Además, es importante mencionar que cuando los organismos se encuentran en la fase

de muda se afecta la acumulación de OTC, ya que durante esta fase el organismo deja de alimentarse y su metabolismo y la actividad celular cambian, disminuyendo los niveles de acumulación del fármaco.

En la Figura 1 se observa un cromatograma de una muestra de hepatopáncreas correspondiente a la etapa de tratamiento, donde se aprecia el pico cromatográfico de la acumulación de OTC, con un tiempo de retención de 3,87 min.

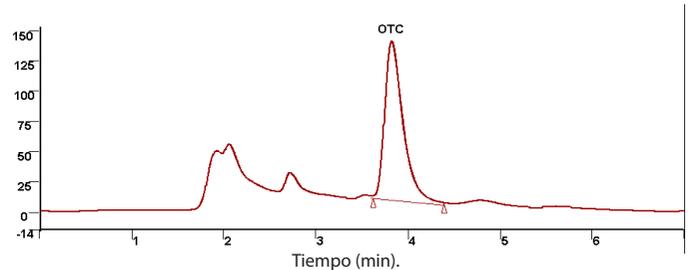


Figura 1. Cromatograma de una muestra de hepatopáncreas de camarón correspondiente al tratamiento con OTC. Condiciones de determinación: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 9010, en fase inversa. Columna supelco de nucleosil C_{18} de $150 \times 4,6 \text{ mm}$ de DI. Detector ultravioleta (UV-VIS) Varian 9050, λ 365 nm, flujo isocrático de 1 mL min^{-1} . Tiempo de corrida: 7 min.

Figure 1. Chromatogram of a sample of shrimp hepatopancreas corresponding to treatment with OTC.

Conditions of determination: High Resolution Liquid Chromatography Varian 9010, reverse-phase. Column supelco nucleosil C_{18} $150 \times 4,6 \text{ mm}$ of ID. UV-Detector Varian 9050, λ 365 nm, isocratic flow of 1 mL min^{-1} . Time of run: 7 min.

Durante la etapa de retiro, se observó la disminución de la concentración de OTC en el hepatopáncreas, oscilando desde $11,99 \pm 0,02$ hasta $0,49 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ conforme avanzaba esta etapa, hasta que 10 días después de suspender la dieta medicada no se detectaron residuos de OTC. En músculo la eliminación fue más lenta y los residuos de OTC fueron detectados durante catorce días de la etapa de retiro, con niveles de $13,35 \pm 0,007 \mu\text{g g}^{-1}$ hasta $0,2 \pm 0,005 \mu\text{g g}^{-1}$. Para el día dieciséis de eliminación los residuos de OTC no fueron detectables, es decir, su concentración estaba por debajo del límite de detección ($<0,01 \mu\text{g g}^{-1}$).

Un ejemplo de la acumulación de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón, correspondiente a uno de los estanques evaluados se muestra en la Figura 2. La C_{max} de OTC en hepatopáncreas en este estanque se obtuvo al cuarto día de tratamiento y fue de $337,17 \pm 0,85 \mu\text{g g}^{-1}$. A los ocho días de la etapa de retiro los residuos de OTC se cuantificaron en concentraciones de $0,18 \pm 0,04$ a $0,95 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ y al décimo día ya no fueron detectados o se encontraban por debajo del límite de detección ($<0,01 \mu\text{g g}^{-1}$). La acumulación de OTC en músculo fue menor a la alcanzada en hepatopáncreas (Figura 2). Una C_{max} de $34,76 \pm 0,92 \mu\text{g g}^{-1}$ se detectó en músculo al cuarto día de tratamiento. Durante la etapa de retiro las

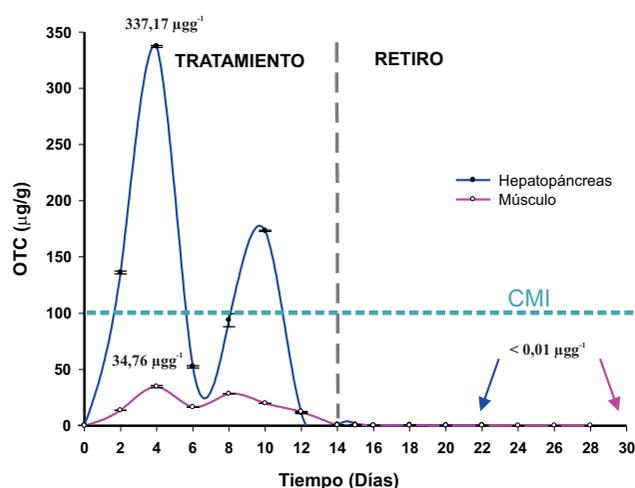


Figura 2. C_{max} de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei*, durante el tratamiento y retiro.

Figure 2. C_{max} of OTC in muscle and hepatopancreas of shrimp *L. vannamei*, during treatment and withdrawal time.

concentraciones de OTC en los distintos estanques estuvieron en un intervalo de $0,01 \pm 0,001$ a $0,29 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ y al día dieciséis los niveles de OTC en este tejido se encontraron por debajo del límite de detección ($< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$) y de los Límites Máximos de Residuos establecidos en el *Codex Alimentarius* (1990) para OTC en músculo de todas las especies marinas cuyo valor es de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Entre los factores que pueden intervenir en la acumulación y tiempo de retiro de OTC en los organismos, se encuentra la presencia de cationes como Ca y Mg los cuales influyen de manera importante en la acumulación de los antibióticos. También, el hepatopáncreas contiene lípidos, glucógeno y varias enzimas digestivas y emulsificantes que influyen en la absorción de OTC (Faroongsarng et al., 2007).

Es importante adicionar la dieta con niveles adecuados de antibiótico considerando que éste debe distribuirse uniformemente en el alimento sin afectar la aceptación por los organismos y la disponibilidad del fármaco por la composición de la dieta. Montoya y Reyes (2002) reportaron que en agua de mar la OTC sufre una pérdida significativa, ya que ocurre un rápido desprendimiento del fármaco en las primeras dos horas de estar en contacto el "pellet" con el agua, alcanzando hasta un 73% de pérdida después de 6 h de lixiviación. Por ello, los alimentos medicados son suplementados comúnmente con concentraciones de antibióticos entre los $2000\text{-}5000 \text{ mg Kg}^{-1}$ considerando una fortificación en exceso para asegurar una dosis adecuada después del proceso de manufactura y de las pérdidas del fármaco por el contacto con el agua. Esto debe ser tomado en cuenta, para poder lograr una concentración acumulada en los tejidos del camarón que inhiba el desarrollo bacteriano.

Recuento bacteriano de *Vibrio*

Los recuentos de bacterias de *Vibrio* en el hepatopáncreas y músculo de *L. vannamei* fueron variables, y no

se observó una relación consistente durante las etapas de tratamiento y retiro en los tejidos analizados.

En promedio los recuentos de *Vibrio* en hepatopáncreas fueron de $5,3 \times 10^3 \text{ UFCg}^{-1}$, presentándose cuentas de $3,7 \times 10^2 \text{ UFCg}^{-1}$ al inicio de la etapa de retiro y de $5,8 \times 10^2 \text{ UFCg}^{-1}$ al final de esta etapa. En músculo los recuentos bacterianos fueron $< 10 \text{ UFCg}^{-1}$ durante el tratamiento con OTC y se incrementaron a $2,7 \times 10^2 \text{ UFCg}^{-1}$ durante el periodo de retiro del antibiótico.

Los organismos sometidos a las mismas condiciones de cultivo, pueden responder de manera distinta a los factores ambientales debido a la actividad de su sistema de defensa. Los brotes de enfermedades en los sistemas de cultivo son el resultado de un ambiente deteriorado, determinado por diversos factores como, la intensificación del cultivo, los parámetros físicoquímicos del agua y el estado fisiológico de los organismos. Estos factores comprometen la respuesta inmunológica de los organismos induciendo un aumento en la susceptibilidad a patógenos normalmente presentes en el agua, como son las bacterias de *Vibrio* (Chang-Che y Jiann-Chu, 2008).

Identificación molecular de cepas de *Vibrio*

Para la identificación de *V. parahaemolyticus* se analizaron 84 cepas aisladas de músculo y hepatopáncreas de camarón, de las cuales 43 fueron positivas para esta especie, representando un 51,19 %, lo cual mostró la alta prevalencia de esta especie en los organismos. Para la identificación de *V. cholerae* O1 toxigénico se analizaron 96 de las cepas aisladas, siendo todas negativas a esta especie.

La familia *Vibrionaceae* representa el grupo más importante de patógenos oportunistas de larvas y juveniles de *L. vannamei* (Muñoz et al., 2004). En el año 1950 *V. parahaemolyticus* fue reconocido como un agente transmisor de enfermedades por alimentos (ETA) (Heitmann et al., 2005). En investigaciones realizadas por Ferrini et al. (2008), se analizaron 92 cepas de *Vibrio*, siendo el 3% resistentes a tetraciclina, correspondiendo en su totalidad a cepas de *V. parahaemolyticus*.

Estos resultados ratifican la importancia de monitorear este género bacteriano ya que esta misma especie fue identificada mayormente en las cepas aisladas de los estanques de cultivo estudiados. Sin embargo, es importante señalar que la flora asociada a camarón no es muy estable y está influenciada por la flora bacteriana del ambiente y del alimento administrado (Vandenberhe et al., 1998).

Vibrio cholerae no es una especie que se considere parte de la flora natural del camarón. Se reconocen 193 serogrupos "O" de los cuales sólo O1 y O139 pueden causar la enfermedad (Bi et al., 2001; Basu et al., 2000). La presencia de *V. cholerae* en los alimentos implica un riesgo considerable para la salud humana. Por lo que, las especificaciones sanitarias establecen que este microorganismo debe estar ausente en 50 g de muestra de productos de la pesca (NOM-029-SSA1-1995).

La utilización de la técnica analítica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es aplicada en el diagnóstico de ciertas infecciones ocasionadas por cepas de *Vibrio* en camarones (Olsen, 2000). Esta técnica permite identificar microorganismos que no pueden ser estudiados por métodos convencionales o que no son cultivables en sustratos artificiales (Rojas-Herrera y González-Flores, 2006).

El uso de PCR para la identificación de bacterias patógenas es sumamente importante, una detección precisa y temprana de estos patógenos es un factor crucial para el éxito de los cultivos y la acuicultura (Cunningham, 2002; Tarr *et al.*, 2007). Mediante esta técnica es posible identificar molecularmente genes que producen toxinas, o hacer caracterizaciones de cepas y evaluar su rol patogénico. Algunos genes de virulencia han sido identificados en cepas de *Vibrio* aisladas de ambientes acuáticos y se ha demostrado su contribución en infecciones, patologías entéricas y septicemias en humanos que fueron expuestos a agua de mar (Mustapha *et al.*, 2012).

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)

La sensibilidad a OTC, ENRO y FFC encontrada en las bacterias de *Vibrio* aisladas de los diferentes tejidos de camarón fue variable (Tabla 4). Las mayores CMI fueron para OTC (0,75 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mostrando que las bacterias expuestas a este antibiótico desarrollaron mecanismos de resistencia que evitan la acción bacteriostática de OTC. Esto surge como resultado del uso frecuente de este antibiótico en las granjas camaronícolas. Algunos autores han reportado distintos valores de CMI para OTC en granjas camaronícolas como, Roque *et al.* (2001), quienes encontraron valores de 304 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los cuales fueron tres veces más altos a los encontrados en este estudio.

Soto-Rodríguez *et al.* (2008) reportaron que la mayoría de las CMI de OTC en cepas de *Vibrio* aisladas de camarones (de larvas a juveniles) están entre 0,125 a más de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Chanratchakool *et al.* (1995) y Ruangpan y Kitao (1992), determinaron CMI para OTC en intervalos de 0,39 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0,2 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, valores similares a los obtenidos en este estudio. Debe tomarse en cuenta que la resistencia antibiótica a OTC es mediada por plásmidos lo que facilita la adquisición o pérdida de la resistencia.

Las concentraciones requeridas de ENRO y FFC para inhibir las bacterias de *Vibrio* son similares entre sí, y menores a las de OTC, esto puede deberse a que la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos varía aun siendo del mismo género. Roque *et al.*, (2001) reportaron concentraciones inhibitorias para ENRO y FFC de 0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 1,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, las cuales se encontraron dentro del rango obtenido en esta investigación. Soto-Rodríguez *et al.* (2008) manifestaron que son pocos los estudios que han obtenido CMI para ENRO y FCC en cepas de *Vibrio spp.* aisladas de camarones enfermos, y los existentes han reportado valores de 0,05 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0,5-4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ENRO y FFC, respectivamente.

Los valores de la CMI en las cepas control de *V. parahaemolyticus* y *V. splendidus* para OTC, ENRO y FFC se muestran en la Tabla 4. Estos valores se encontraron dentro de los intervalos determinados en el sistema de cultivo evaluado. Es importante señalar que cepas de *V. parahaemolyticus* o *V. splendidus* que pudieran estar presentes en un sistema de cultivo no necesariamente presentarán la misma sensibilidad a los antibióticos que las cepas control, ya que la sensibilidad que muestran las bacterias puede estar determinada por las condiciones de desarrollo ambiental. Por tanto, las C_{max} alcanzadas de OTC durante el tratamiento pudieran ser sólo efectivas para aquellas cepas bacterianas que presenten una CMI menor a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 4. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para bacterias de *Vibrio* aisladas de tejidos de camarón *L. vannamei* cultivado.

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for bacteria of *Vibrio* isolated of tissues of shrimp *L. vannamei* cultured.

	OTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ENRO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FFC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Hepatopáncreas	0,75-100	0,25-10	0,5-5
Músculo	5-100	0,25-5	0,75-5
<i>V. parahaemolyticus</i>	50	5	5
<i>V. splendidus</i>	10	5	5

CONCLUSIONES

Los niveles de acumulación máxima de OTC en hepatopáncreas y músculo de camarón de cultivo se alcanzaron entre los 2 y 12 días de la etapa de tratamiento, y un período de retiro de 16 días fue suficiente para lograr niveles de OTC en ambos tejidos por debajo del límite de detección y del límite máximo permitido.

Las CMI contra *Vibrio* de camarón cultivado presentaron el mayor valor para OTC comparado con ENRO y FFC, lo que comprobó que OTC sigue siendo el antibiótico más utilizado.

Los niveles de acumulación alcanzados en los tejidos de camarón que recibieron la dieta con OTC pudieron inhibir el desarrollo de bacterias que presentaron una CMI en el intervalo de 0,75 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sin embargo se pueden requerir concentraciones mayores considerando que no todo el antibiótico acumulado en el organismo está biodisponible.

De las cepas aisladas de músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* el 51,19% se identificaron como *Vibrio parahaemolyticus*, determinándose específicamente para esta especie una CMI de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para OTC y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ENRO y FFC. No se encontró *V. cholerae* O1 toxigénica.

Se concluye que el uso de alimentos medicados se ha vuelto un problema debido al incremento en la resistencia bacteriana y la elevación de las CMI de OTC para las bacterias aisladas de las granjas de cultivo de camarón.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Ingenieros Roberto Federico Aguayo Valenzuela y César Eduardo Patiño Patiño, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de la fase experimental de esta investigación en la granja acuícola "La Borbolla", así como el soporte técnico por parte del Biól. Adolfo Pérez Álvarez y el Técnico Juan Carlos Gastélum Domínguez. Así mismo expresan el agradecimiento por su apoyo técnico a la QB. Rosalva Pérez Morales.

REFERENCIAS

- Alderman, D.J. y Smith P. 2001. Introduction-Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*. 196:211-243.
- Auró, A., Ocampo, L. 2006. El libro del camarón. México, D.F. pp.83, 84, 87.
- Basu, A., Garg, P., Datta, S., Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Khan, A., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Yamasaki, S., Takeda, Y. y Nair, G.B. 2000. *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, 1992-1998: Incidence, Antibigrams, and Genotypes. *Emerging Infectious Diseases*. 6:139-147.
- Bi, K., Miyoshi, S.I., Tomochika, K.I. y Shinoda, S. 2001. Detection of virulence associated genes in clinical strains of *Vibrio mimicus*. *Microbiology and Immunology*. 45:613-616.
- Boyd, C. 2001. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. En: Haws, M.C., Boyd, C.E. (Eds) *Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica*. Editorial imprenta UCA, Managua, Nicaragua, pp. 24-25.
- Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E. y Burnett, K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunology*. 22:327-339.
- Chang-Che, L. y Jiann-Chu, C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 25:701-709.
- Chanratchakool, P., Pearson, M., Limsuwan, C. y Roberts, R. J., 1995. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases*. 18(1):79-82.
- Comisión del *Codex Alimentarius*. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias. Informe de la Quinta Reunión del Comité del Codex Sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios. Washington, DC. 16-19 de octubre de 1990. p.42.
- Cunningham, C. 2002. Molecular diagnostics of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*. 206:19-55.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C. y Guillaume, J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235:513-551.
- Decamp, O., Moriarty, D.J. y Levens, P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*. 39:334-338.
- FAO 2012. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. Pág. 28-42, 86-86.
- Faroongsarng, D., Chandumpai, A., Chiayvareesajja, S., y Theapparatt, Y. 2007. Bioavailability and absorption analysis of oxytetracycline orally administered to the standardized moulting farmed Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 269:89-97.
- FDA. 2014. Tolerance for residues of new animal drugs in food. Electronic Code of Federal Regulation. Food and Drugs. <http://www.ecfr.gov/cgi>.
- Ferrini, A.M., Mannoni, V., Suffredini, E., Cozzi, L. y Croci, L. 2008. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. *Food Analytical Methods*. 1:164-170.
- Ganesh, E.A., Das, S., Chandrasekar, K., Arun, G. y Balamurugan, S. 2010. Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. In an aquaculture pond. *Current Research Journal Biological Sciences*. 2(1):48-52.
- Garfield, M. F. 1993. Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos. Association Official Analytical Chemistry International. Ed. Española. Estados Unidos de América. Pág. 73-76.
- Gómez-Gil, B., Tron, M. L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. y Guerra, F. L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163:1-9.
- Gómez-Jimenez, S., Espinosa-Plascencia, A., Valenzuela-Villa, F. y Bermúdez-Almada, M.C. 2008. Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture*. 274:24-29.
- Hernández, R. M., Buckle, F., Palacios, E. y Barón, B. 2006. Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction. *Journal of Thermal Biology*. 31:565-572.
- Heitmann, I., Jofré, M.L., Hormázabal, O.J.C., Olea, A., Vallebuona, S.C. y Valdés, H.C. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología*. 22:131-140.
- Houglum, J., Larson, R., Knutson, A. (1997). Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, 80:961-965.
- Leyton, Y., Riquelme, C. 2008. *Vibrios* en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3):441-456.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X. y Qin, J.G. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*. 274:80-86.
- Montserrat, E. y Herrera, F. 2000. Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille 1817) (Crustacea: *Penaeidae*) experimentalmente infectados con *Vibrio alginolyticus*. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 12(1):14-20.
- Montoya, N. y Reyes, E. 2002. Acumulación/eliminación de oxytetraciclina en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, y su residualidad en dietas artificiales. *El Mundo Acuícola*, 8(1):34-37.

- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D. y Bachère, E. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic *Vibrio*. Cellular and Molecular Life Sciences. 61:961-972.
- Mustapha, S., Mustapha, M.E., Brahim, B. y Nozhal, C. 2012. Characterization of *Vibrio Alginolyticus* Trh Positive From Mediterranean Environment of Tamouda Bay (Morocco). World Environ. 2:76-80.
- Nogueira-Lima, A., Gesteira, T. y Mafezoli, J., 2006. Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. Aquaculture. 254 748–757.
- NOM-029-SSA1-1995. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Productos de la pesca. Crustáceos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de Febrero de 1995.
- NCSS versión 2007 Raysville, UTAH, USA.
- Olsen, J. E. 2000. ADN-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. Food Research International. 33:257-266.
- Rojas-Herrera, R. y González-Flores, T. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica. 31:69-76.
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolan-Mejía, C. y Gomez-Gil, B. 2001. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of *Vibrios* isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents. 17:383-387.
- Rosen, E.P. y Pedersen, A. J. 2005. Fate of oxytetracycline in streams receiving aquaculture discharges: model simulation. Environmental Toxicology and Chemistry. 24(1):40-50.
- Ruangpan, L. y Kitao, T. 1992. Minimal inhibitory concentration of 19 chemotherapeutants against *Vibrio* bacteria of shrimp, *Penaeus monodon*. En: Shariff M., Subasinghe R., Arthur J. R., (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture. Asian Fisheries Society, Manila. p 135-142.
- Santiago-Hernández, M.L. 2009. Acumulación de oxitetraciclina (OTC) en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y pruebas de sensibilidad en bacterias tipo *vibrio* aisladas de un sistema de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. pp. 45-50.
- Soto-Rodríguez, S.A., Simoes, N., Roque, A. y Gómez-Gil, B. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. Aquaculture. 258:109-115.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Roque, A. y Lozano, R. 2008. MIC'S de antibióticos de *Vibrio spp* aislados de *L. vannamei* cultivado en México. Panorama Acuicola Magazine, Nov-Dic. pp. 53-56.
- Tar, C.L., Patel, J.S., Puhr, N. D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. y Strockbine, N.A. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:134-140.
- Tendencia, E.A. y De la Peña, L.D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture. 195:193-204.
- Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R.J. y Rowley, A.F. 2010. An *in vitro* and *in vivo* assessment of the potential of *Vibrio spp.* as probiotics for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal Applied Microbiology. 109:1177-1187.
- USDA, 1987. Food Safety and Inspection Service. Determining Acceptability of Methods for Regulatory Purpose (2.2.3). Chemistry Laboratory Quality Assurance Handbook. Vol. II, United States Department of Agriculture, Beltsville, MD. USA.
- Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S. y Swings, J. 1998. *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in chinese shrimp hatcheries. Aquaculture. 169:121-132.
- Veyrat, A., Millares, M.C. y Pérez, M.G. 1999. A fast method for monitoring the colonization rate of *lactobacilli* in a meet model system. Journal of Applied Microbiology. 87:49-61.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J. y Gao, T. 2009. Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. 40:1419-1427.